

# 生体高分子を薬物担体とした制癌薬の腫瘍指向化

田中哲郎、金尾義治

## Tumor Targeting of Anticancer Drugs by the Use of Macromolecular as Carriers

Tetsuro TANAKA and Yoshiharu KANEO

### ABSTRACT

Macromolecular drug carriers offer significant promise for the selective delivery of anticancer drugs. A variety of drug-macromolecule conjugates have been demonstrated *in vitro* and *in vivo*. The idea behind using the conjugates is that they may show improvement in the distribution of the drug. This review discusses the use of drug-macromolecule conjugates for tumor targeting and, as an example, shows our experimental challenge using mitomycin C-albumin conjugates.

### 【はじめに】

薬物療法の効果を高め医薬品の副作用を軽減するためには、薬物を選択的に作用部位へ送達し、有効な濃度を維持させることが肝要である。この概念は今世紀初頭Ehrlichによって唱えられ、病原微生物に対して選択的な毒性を有する化学療法剤が誕生した。この化学療法の考えは抗生物質の開発へと発展し、感染症に対する有効な治療法の基礎となった。しかしながら、疾患の原因が未だ解明されず、選択的な薬効を有する物質が見いだされていないものも数多い。悪性腫瘍はこの様な疾患の代表例であるが、近年我が国の死亡原因の第1位を占めるに至り、より有効な治療薬の開発が望まれている。一方、生物薬剤学及び関連分野の発展に伴い薬物の体内動態を評価することが可能となり、効率の良い薬物療法を目的としたドラッグデリバリーシステム(DDS)が様々な角度から検討されている。中でも作用部位への送達はターゲティングと呼ばれ、種々の薬物担体(キャリアー)を利用する方法が試みられている。このキャリアーシステムは、細網内皮系が異物を捕捉するような生体自身が備えている機能を利用するものと、糖タンパク質や抗体のようにそれ自体がレセプターや抗原と特異的に結合する性質を利用するものとに大別できる。本総説

では制癌薬のキャリアーとして生体高分子を利用する試みを取り上げると共に、著者らの血清アルブミンを用いたマイトマイシンCの高分子ハイブリッドに関する知見を紹介する。

## 1. 高分子キャリアーの種類

キャリアーはその形状から微粒子性のものと高分子性のものに分類される。また、調製法には薬物をキャリアーへ物理的に取り込ませる方法と化学的に結合させる方法がある。高分子をターゲッティングに利用する場合、一般に後者の化学修飾による結合体の合成が行われている。この方法はリポゾームやマイクロスフェア等の微粒子性キャリアーに比べて、合成過程を伴うため調製法の適用範囲に限られる。しかしながら、高分子キャリアーと薬物の結合体は一般に医薬品として安定で、滅菌操作が簡単であるといった利点を有する。

高分子キャリアーとしては、合成高分子や天然高分子が用いられ、いずれも制癌薬のターゲッティングへの利用が検討されている。水溶性の合成高分子としては、生体への適合性に問題があるが、ポリリジンやポリグルタミン酸などがあげられる(Whitely, 1980, Roos, 1984)。これに対して、一般に生体への適合性が高いと考えられている天然高分子としては、血清アルブミン(Trouet, 1982, Halbert, 1987, 1989)、アシアロフェツイン(Fiume, 1979, Furuno, 1983, Kaneo, 1991)、トランスフェリン(Urushizaki, 1986)、免疫グロブリン(Suzuki, 1981, Shouval, 1988)、デオキシリボ核酸(Trouet, 1972)、デキストラン(Kojima, 1980, Onishi, 1987)、キトサン(Sanzgiri, 1990)などがあり、いずれも高分子キャリアーとしての利用が試みられている。

## 2. 高分子キャリアーを利用した腫瘍へのターゲッティングの現状

腫瘍へのターゲッティングを目標としたこれまでの一般的な方法論については、Hashida(1992)の総説によくまとめられているので参考にされたい。ここでは、モノクローナル抗体をキャリアーとして利用する試みと、腫瘍組織の特徴を利用するターゲッティングについて簡単に述べることにする。

抗原に対して高い選択的結合能を示すモノクローナル抗体は、悪性腫瘍のミサイル療法のキャリアーとして期待されている。しかしながら、未だヒト由来のモノクローナル抗体は得られていないのが現状である。更に、腫瘍表面の抗原が変化したり、あるいは循環系へ逸脱したりするため、モノクローナル抗体のホーミングデバイスとしての有効性は減弱することが予想されている。また、腫瘍表面の抗原と特異的に結合したとしても、細胞内への取り込み機能がないため、ゲスト分子である制癌薬を細胞内へ送達するのは困難な場合が多い。したがって、現時点ではモノクローナル抗体をキャリアーとして利用する試みが、*in vivo*系で十分な成果を納めているとは言い難い(Irie, 1986, Hara, 1987)。これに対して、Fig.1に示すように、腫瘍組織では血管系が発達しその透過性が亢進しているにもかかわらず

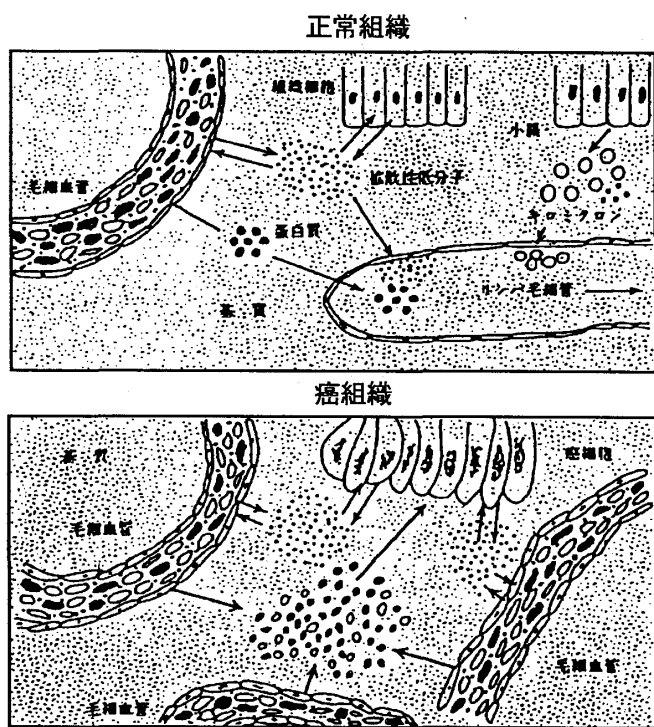


Fig.1 正常組織と癌組織における脈管系の違い  
(前田 浩, 代謝, vol. 23 臨時増刊号 癌 '86, 1986, p.249.)

Table 1 Amino Acid Composition of Three Serum Albumins

Amino acid	Bovine	Human	Rat
Aspartic acid	41	36	32
Asparagine	13	17	20
Threonine	34	28	33
Serine	28	24	24
Glutamic acid	59	62	57
Glutamine	20	20	25
Proline	28	24	30
Glycine	16	12	17
Alanine	46	62	61
Valine	36	41	35
l-Cystine	35	35	35
Methionine	4	6	6
Isoleucine	14	8	13
Leucine	61	61	56
Tyrosine	19	18	21
Phenylalanine	27	31	26
Lysine	59	59	53
Histidine	17	16	15
Tryptophan	2	1	1
Arginine	23	24	24
Total	582	585	584
Number of nitrogen atoms	779	786	785
Calculated net charge, pH 7	-18	-15	-12
Average residue weight	113.86	113.57	112.79

From Peters T. Jr. (1985) Advances in Protein Chemistry, 37, 165.

らず、体液の回収系であるリンパ系は未発達であることが知られており、一般に高分子は受動的に腫瘍へ集積すると考えられている (Jain, 1987)。この特徴を利用するターゲティングについては Maeda(1992)らの総説に詳しく述べられている。特に、彼らは脂溶性の合成高分子であるポリスチレンマレイン酸をキャリアーとして、タンパク性の制癌薬であるネオカルチノスタチンとの結合体(SMA-NCS)を合成し、X線の造影剤であるリピオドールに溶解させ肝動注することにより、肝癌に対して良好な治療成績をあげている。しかしながら、この方法は肝動注という高度な投与技術を要するため、治療法を一般化する上で問題があり、投与法の簡便な静脈系を介した制癌薬の腫瘍ターゲティングが望まれている。

### 3. 血清アルブミンの性質と高分子キャリアーとしての有用性

血清アルブミンは血漿タンパク質の約60%を占めるもので、生体では浸透圧の調整や栄養物の血中における輸送と貯蔵の役割を果している (Aoki, 1984)。特に、ヒト血清アルブミンはTable 1に示すように、585個のアミノ酸から成る分子量66,458のタンパク質であり、そのアミノ酸配列も明ら



ルブミンは医薬品の体内動態を考える上でも重要な生体成分のひとつである。このタンパク結合は医薬品の体内分布に著しい影響を与えるのみならず、代謝、排泄にも影響を及ぼすことが知られており(Otagiri, 1985)、薬物相互作用にも関連することから、薬物療法上十分な注意を払わねばならない現象である。このような医薬品のタンパク結合については、医薬品とタンパク質との疎水的な相互作用による吸着現象が重要な役割を演じていると考えられている。このタンパク結合能を利用し、SMANCSの生体内半減期を延長させる試みもあるが(Kobayashi, 1988)、吸着現象は動的な平衡状態であることから、体内での医薬品の放出性を制御するには更なる工夫が必要であると考えられる。

いずれにしても、血清アルブミンは代表的な生体高分子であり、Fig.1に示すような腫瘍組織の特徴に従って腫瘍部位へ集積すると考えられる(Matsumura, 1986, Maeda, 1992)。更に、腫瘍細胞は高分子を貪食する能力が高いことも知られており(Ryser, 1967)、血清アルブミンを薬物担体として利用することにより、医薬品を腫瘍組織へ指向させることが可能であると推測される。

血清アルブミンの高分子キャリアとしての有用性は、その物理的、化学的あるいは生物学的な性質から予想できるが、要約するとTable 2のようになる。すなわち、血清アルブミンは医薬品との吸着能を有することから、タンパク結合を介した高分子医薬化が可能である。更に、その構造中に酸性アミノ酸、塩基性アミノ酸さらには含硫アミノ酸といった、化学反応性に富んだ官能基を有するアミノ酸を数多く含有していることから(Table 1)、共有結合を介した医薬品との高分子ハイブリッド化が可能である。また、血清アルブミンは輸送タンパク質のひとつでもあり、生体に投与した場合循環血中へ長時間滞留する。したがって、血清アルブミンを用いた高分子ハイブリッド化により、短時間消失型薬物及び酵素の生体内持続化が可能であると考えられる。更に、その腫瘍集積性を利用できれば、制癌活性物質を腫瘍部位へ指向させる製剤、言わば、腫瘍指向性高分子ハイブリッド医薬の開発が可能となる。

これまでに高分子キャリアとしての血清アルブミンの有用性について論じてきたが、製剤への応用例を、特に分子に対する修飾法からまとめてみるとTable 3のようになる。血清アルブミンは無修飾の形で製剤学的処置を施した後、生物学的製剤として低アルブミ

Table 2 血清アルブミンの高分子キャリアとしての有用性

性質と機能	応用
タンパク結合能を有する	タンパク結合を介した高分子医薬化
反応性の官能基を有する	共有結合を介した高分子ハイブリッド医薬の合成
体内に長時間滞留する	短時間消失型薬物並びに酵素の持続化
腫瘍集積性を有する	制癌活性物質の腫瘍部位への指向化

Table 3 血清アルブミンの製剤への応用

修飾法	応用
無修飾	生物学的製剤
物理的修飾	タンパク結合能の利用 微粒子性薬物運搬体
化学修飾	酵素の持続化 免疫原性の回避

ン血症や出血性ショックに適用されており、生体に対して安全なものであることが確認されている。一方、熱や振動といった物理的エネルギーを加えて変性させ、微粒子性の薬物運搬体(アルブミンマイクロスフェア)とする試みもある(Kramer, 1974, Morimoto, 1989)。また、Poznansky(1980)らは酵素治療の問題点である体内持続性の向上を目的とし、

血清アルブミンで酵素を化学的に修飾する方法を提案している。このような化学的な修飾法の中で製剤学的な観点からも興味を持たれているものとして、各種タンパク性医薬品のポリエチレングリコール修飾による免疫原性の回避と持続化に関する試みがある。これはAbuchowski(1977a, 1977b)らの血清アルブミンとカタラーゼを用いた実験に端を発している試みである。この修飾はPEG化と呼ばれ、L-アスパラギナーゼの抗腫瘍性を増大させ抗原性を消失させることが、Inadaらのグループにより報告されている(Kamisaki, 1981)。先に述べた高分子キャリアーを医薬品のターゲッティングに利用するDDSも、この化学的修飾の範疇に入るものである。

#### 4. 薬物-高分子ハイブリッドの合成法とその問題点

薬物と血清アルブミンとの結合反応を設計する際、有用と考えられる血清アルブミンの官能基をTable 4に示す。親電子性あるいは求核性を有する代表的な官能基としてカルボキシル基やアミノ基が挙げられる。ヒト血清アルブミンの場合、アスパラギン酸、グルタミン酸及びC-末端に由来する99個のカルボキシル基、並びにリジンとN-末端に存在する60個のアミノ基は、それぞれ他の官能基に比べて数も多く、薬物との反応効率の面からも特に有用であると考えられる。もちろん、結合反応には薬物の構造も考慮しなければならない。薬物側に反応性の官能基がない場合、血清アルブミン側に対応した適当な官能基を導入する必要がある。このように高分子を化学修飾型のキャリアーとする際には、薬物の構造面からの制限を受けるため、微粒子性キャリアーに比べて適用できる薬物が限られてくる。更に、結合反応の選択に当っては、反応時に薬物と高分子キャリアーが分解を受けないものを選ぶことが必要最低条件である。特に、血清アルブミン等のタンパク質をキャリアーとする場合、変性を来すような反応を避けることはもちろんであるが、タンパク質はカルボキシル基とアミノ基を同一分子内に持っているため、薬物とタンパク質間に酸アミド結合を形成させる際には、タンパク質同士の結合(重合)に注意しなければならない。反応条件に大きく左右されるが、重合反応等によって不溶化する場合もある(Tanaka, 1993)。このような問題点を乗り越えたとしても、薬物の薬効やキャリアーの特

性が化学修飾によって失われる恐れがある。したがって、得られた高分子ハイブリッド自体が薬理活性を有するものであるか、あるいはプロドラッグとして作用するものであるかを評価すると共に、キャリアーの特性を保持したものであるかを評価することが、結合反応を設計する際の十分条件であると考えられる。以上、高分子ハイブリッド化に関する問題点について論じたが要約すると Table 5 のようになる。具体的な合成法並びに合成例は

Table 4 高分子化に利用できる血清アルブミンの反応性官能基

反応性官能基	由来
カルボキシル基	C 末端、アスパラギン酸、グルタミン酸
アミノ基	N 末端、リジン
イミダゾール基	ヒスチジン
フェノール基	チロシン
チオール基	システイン
グアニジノ基	アルギニン

Table 5 タンパク質をキャリアーとして利用する高分子ハイブリッド医薬の合成に関する問題点

部位	問題点
ゲスト医薬側	結合反応に利用できる官能基の存在
タンパク質キャリアー側	タンパク質の変性 タンパク質分子同士の結合 (アグリゲーション) 生理機能の消失
高分子ハイブリッド医薬として	高分子ハイブリッド医薬自体の薬理活性 薬理活性物質の遊離放出性 (プロドラッグとしての作用)

Table 6 血清アルブミンを高分子キャリアーとした制癌薬の高分子ハイブリッド

医薬品 (酵素)	結合法	文献
Daunomycin	Mixed anhydride	Szekerke et al., 1974
Methotrexate	Carbodiimide	Chu and Whiteley, 1977
Methotrexate	Carbodiimide (ECDI)	Magnenat et al., 1969
Methotrexate	Diazotization	Harding, 1971
Actinomycin D	Binding	Szekerke and Driscoll, 1977
Cytosine arabinoside	Carbodiimide	Szekerke and Driscoll, 1977
Methotrexate	Ester linkage	Islaker et al., 1964
L-Asparaginase	Glutaraldehyde	Poznansky, 1977, 1979
Cytosine arabinoside	Carbodiimide	Balboni et al., 1976

Poznanskyらの総説に詳しく述べられているので参考にされたい。Table 6に血清アルブミンを用いた例をまとめて示す。

#### 5. 血清アルブミンをキャリアーとしたマイトマイシンCの高分子ハイブリッド医薬

現在、臨床に用いられている制癌薬はアルキル化剤、代謝拮抗物質、抗生物質、免疫学的抗腫瘍薬などに分類されるが(Tanaka, K., 1988)、抗生物質の中で特に、*Streptomyces caespitosus* から分離されたマイトマイシンC (MMC)は、グラム陽性菌や種々の腫瘍に対して広い抗菌及び抗癌スペクトルを有し(Wakaki, 1958, Sugiura, 1961)、白血病、胃癌、腸癌、肺癌などの治療に用いられている(Kubo, 1985)。しかしながら、MMCは正常細胞の増殖をも阻害するため、骨髄や消化管に対して重篤な副作用を発現する可能性が高く(Philips, 1960)、临床上その使用は制限を受けざるを得ない。その為、薬剤学的見地からMMCの体内分布を改善し、腫瘍部位への選択的な送達系を開発することは、有意義なことと考えられる。この試みは、Gregoriadis(1984)の言う“新しい衣装を着た薬剤”の開発を行うことである。

MMCの高分子ハイブリッド医薬としては、抗体の特異的な結合性を利用し能動的な標的指向化を試みた例があるが(Suzuki, 1981, Kato, 1983, Umemoto, 1984, Iwasa, 1987)、*in vivo*系での適用は、先に指摘したような循環抗原等の問題を抱えている。一方、受動的な標的指向化の例としてデキストランをキャリアーとした一連の先駆的な研究がなされており(Kojima, 1980, Hashida, 1983, 1984, Sezaki, 1985, 1989, Takakura, 1987a, 1987b)、臨床への応用も試みられている(Honda, 1987)。これに対して、生体内因性物質である血清アルブミンをMMCの高分子キャリアーとして利用した例は数少なく(Kato, 1982)、しかもMMCと血清アルブミンの高分子ハイブリッド医薬の合成法、化学的性質、体内動態、腫瘍指向性、並びに制癌効果に関する系統的な検討はほとんど行われていないのが現状である。他の制癌薬では、血清アルブミンをキャリアーとしたものとして、メトトレキサート(Halbert, 1987, 1989)、ダウノルビシン(Trouet, 1982)の例があるが、それら結合体の体内挙動に関する検討はやはり行われていない。このような状況の下、著者らは高分子の腫瘍集積性に着目し、制癌薬の高分子ハイブリッド化による腫瘍ターゲティングの可能性を検討した(Kaneo, 1990, Tanaka, 1991)。

##### 5-1. 高分子ハイブリッドの合成

高分子ハイブリッド化には薬物と高分子キャリアーの官能基が影響する。MMCの化学構造をFig.3に示すが、MMCには制癌活性部位のひとつで反応性に富むアジリジノ基が存在する。そこで、MMCと血清アルブミンの結合体の合成には、このアジリジノ基と血清アルブミンのカルボキシル基との反応を利用することが考えられる。一般にタンパク質と薬物の結合法としては縮合剤であるカルボジイミドやグルタルアルデヒドを用いる方法、



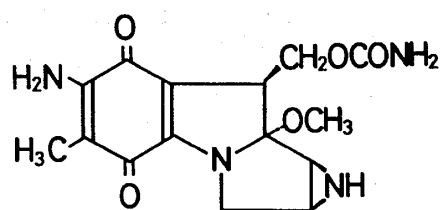
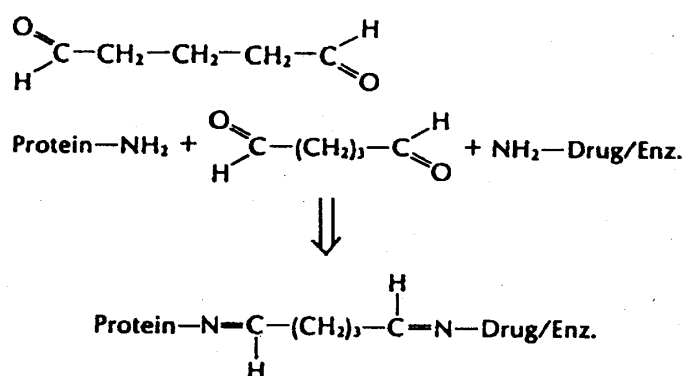
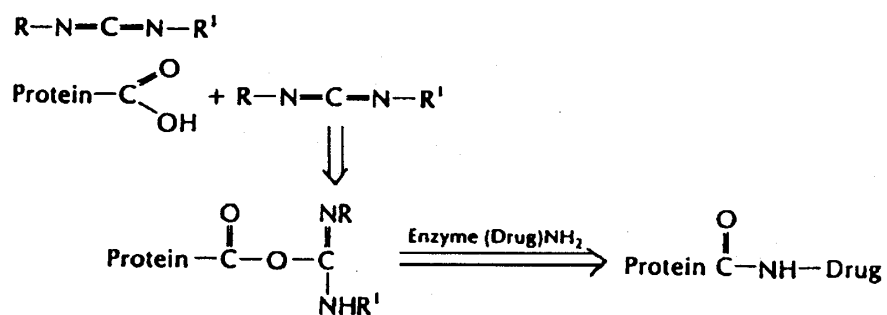


Fig. 3 Structure of Mitomycin C

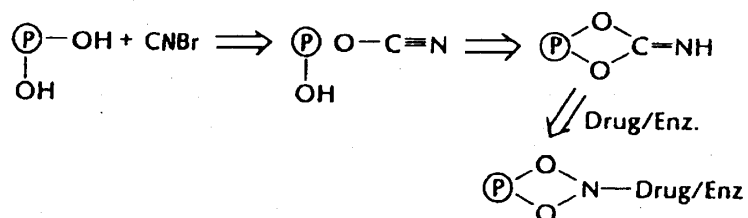
### Glutaraldehyde



### Carbodiimide



### CNBr



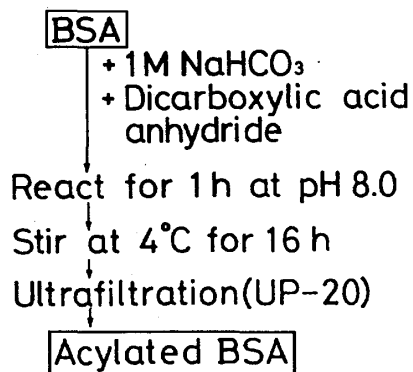
Scheme 1 薬物—高分子結合体の合成法

並びに、臭化シアンを用いた活性化法がある (Scheme 1)。しかしながら、これらの合成法はいずれもタンパク質同士の結合による重合を伴うため、元のタンパク質としての性質が損なわれ、合成時に不溶性の物質を生じることがある。

MMCとタンパク質の結合に関しては、臭化シアン活性化法による抗体との結合 (Suzuki, 1981)、カルボジイミドを用いた牛血清アルブミン (Kato, 1982) 並びにヒト血清アルブミン (Iwasa, 1987) との結合に関する報告がある。しかしながら、この方法はいずれも副反応としてタンパク分子同士の結合を生じることが予想される。例えば、Katoらの報告によると、水溶性カルボジイミドを用いて合成した MMC と牛血清アルブミン (BSA) の結合体 (BSA-MMC) は、BSA に比べて約 3 倍の分子径を示すことから、BSA-MMC は BSA 分子の重合体であることが推測される。

一方、Umemoto (1984) らは血清アルブミンを介した MMC と抗体の結合を試みている。彼らは上記の副反応を伴わないとされている活性エステル体を経由した合成法 (活性エステル法) により、MMC と血清アルブミンの結合体を合成している。しかしながら、この結合体の性質並びに体内動態に関する詳細な検討は報告されていない。そこで著者らは、新たに血清アルブミン同士の結合を防ぎつつ MMC の結合率を向上させる目的で、あらかじめ血清アルブミンに種々の二塩基性酸の酸無水物を作用させ、スパーサーを導入したアシル化牛血清アルブミン (Acylated BSA) を合成した。これに水溶性カルボジイミド共存下 MMC を反応させ、アシル化牛血清アルブミン-マイトマイシン C 結合体 (Acylated BSA-MMC) を合成した (Kaneo, 1990)。更に、活性エステル法による合成を行い、著者らの開発した合成法と比較した (Tanaka, 1991)。

一般にタンパク質のアミノ基修飾法は、修飾による電荷の変化により次の三つに分類される。すなわち、グアニジル化のようにアミノ基の極性が変化しない修飾、アセチル化のようにアミノ基の極性を失う修飾、及びスクシニル化のようにアシル化によりアミノ基の極性が逆になる修飾である。特に、アミノ基のアシル化による高分子ハイブリッド医薬の



Scheme 2 Preparation of Acylated BSA

合成は、薬物の結合率を向上させる点においても有用である (Trouet, 1982)。更に、著者らは二塩基性酸の酸無水物の種類を変えることにより、血清アルブミンに種々のスパーサーを導入した高分子キャリアーの合成が可能であると考えた。そこで、無水グルタル酸、無水コハク酸、無水トランスアコニット酸、無水メチルコハク酸、無水トリメリット酸をそれぞれ BSA に作用させ、種々の Acylated BSA を合成した。BSA のアシル化の反応条件は、Habeb (1958) らおよび Klapper (1972) らの報告に基づき、Scheme 2 に示すような条

Table 7 Acylation Percentages of BSA

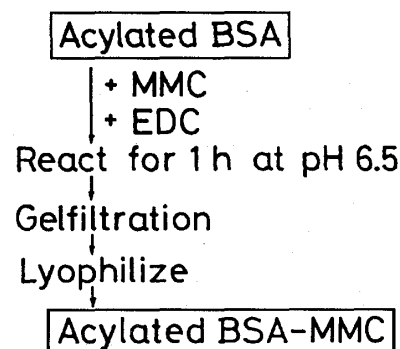
Compound	Acyl group	Acylation %
Glutaryl BSA	$-\text{CO}(\text{CH}_2)_3\text{CO}-$	$95.4 \pm 1.3$
Succinyl BSA	$-\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{CO}-$	$78.7 \pm 6.9$
trans-Aconityl BSA	$-\text{CO}(\text{CHCCOOHCH}_2)\text{CO}-$	$11.1 \pm 4.4$
Methylsuccinyl BSA	$-\text{CO}(\text{CH}_2\text{CHCH}_3)\text{CO}-$	$78.2 \pm 1.8$
Trimellityl BSA	$-\text{CO}(\text{C}_6\text{H}_3\text{COOH})\text{CO}-$	$51.2 \pm 5.6$

件とした。

Acylated BSA のアミノ残基をトリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS)を用いた Fields の方法(1972)に従って定量し、BSAのアシル化率を求めた(Table 7)。

Glutaryl BSA, Succinyl BSA並びに Methylsuccinyl BSA はtrans-Aconityl BSA, Trimellityl BSA に比べて高い値を示した。中でも Glutaryl BSA については95%と最も高い値であった。

Acylated BSA に 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC) 共存下, MMC を作用させて MMC との結合体(Acylated BSA-MMC)を合成した。一般に水溶性カルボジイミドを用いたタンパク質のアミド化は、EDC 等によってカルボ



Scheme 3 Preparation of Acylated BSA-MMC

キシル基を活性化し、アミノ成分と pH4.7 前後の酸性溶液中で反応することが知られている(Maeda, 1981)。しかしながら、MMC は酸性溶液中で分解を受け易いことから、EDC を用いた MMC と Acylated BSA の反応は中性付近の pH において短時間で行うことが好ましいと推測される。そこで、Scheme 3 に示すような反応条件で高分子ハイブリッド医薬化を行った。

得られた Acylated BSA-MMC の吸収スペクトルを測定し、MMC の結合の確認を試みた。代表例として無水グルタル酸を用いて合成した結合体 (G-BSA-MMC) の吸収スペクトルを Fig.4 に示す。BSA 並び

に Acylated BSA は 363 nm 付近に吸収を示さなかったのに対して、いずれの Acylated BSA-MMC も 363nm に MMC の特徴的な吸収を示した。これらの結果から、Acylated BSA-MMC はいずれも MMC の構造を有することか示唆された。更に、Acylated BSA-MMC は、いずれもゲルろ過による精製を行って得られた高分子ハイブリッドであることを考え合わせると、Acylated BSA-MMC は Acylated BSA と MMC が共有結合した高分子であると考えられた。Acylated BSA-MMC の収率と MMC 含量を Table 8 に示す。各結合体のタンパク質としての収率は 68~93% であり、MMC としての収率は 13~41% であった。特に、グルタル酸並びにコハク酸をスペーサーとした結合体(G-BSA-MMC, S-BSA-MMC)の MMC の収率は、それぞれ 41%, 35% と高い値を示した。一方、Acylated BSA-MMC の MMC 含量は 1.7-6.0w/w% であった。中でも、G-BSA-MMC, S-

BSA-MMCのMMCの含量は、それぞれ6.0,4.9w/w%であり、高い値であった。BSA 1モル当りのMMCモル数を算出したところ、G-BSA-MMCでは約12モルを示した。このように、アシル化法では用いたスペーサーの種類によってMMCの結合率は異なり、結

合体を合成する上でスペーサーの選択の重要性が示唆された。更に、アシル化法はEDCを用いてBSAにMMCを直接結合した場合に比べて、EDCは少量であるにもかかわらず、効率よくMMCを結合できる合成法であることが明らかになった。

一方、活性エステル法によるグルタル酸をスペーサーとしたMMCとBSAの結合体の合成を行った。この活性エステル法は、MMCのグルタル酸誘導体(G-MMC)を合成し活性エステル体に導いたのち、BSAと反応させ、グルタル酸を介したBSAとMMCの結合体(BSA-G-MMC)を得る方法である。G-MMCはUmemoto(1984)らの方法に従って合成し、これを用いてFuruno(1983)らの方法で活性エステル化しさらにBSAとの結合を行った。得られ

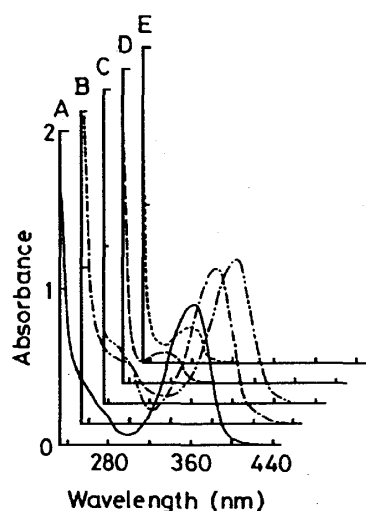


Fig. 4 Representative UV absorption spectra of G-BSA-MMC (A), BSA-G-MMC (B), MMC (C), G-BSA (D), and BSA (E) in 0.9% NaCl.

Table 8 Yield and Composition of Acylated BSA-MMC

Acyl spacer		Yield (%)		MMC content (w/w%)
		as protein	as MMC	
Glutaryl (G)	-CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CO-	68.0	40.8	6.0
Succinyl (S)	-CO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO-	72.2	35.2	4.9
trans-Aconityl (A)	-CO(CH <sub>2</sub> COOHCH <sub>2</sub> )CO-	75.8	12.9	1.7
Methylsuccinyl (MS)	-CO(CH <sub>2</sub> CHCH <sub>3</sub> )CO-	89.6	21.2	2.4
Trimellityl (T)	-CO(C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> COOH)CO-	93.0	20.4	2.2

Table 9 Physicochemical Properties of G-BSA-MMC and BSA-G-MMC

	G-BSA-MMC	BSA-G-MMC	G-BSA	BSA
MMC content w/w %	6.03 ± 0.92	2.82 ± 0.51		
molar ratio	12.1 ± 1.8	5.59 ± 1.00		
free amino residue, <sup>a</sup> mol	1.5 ± 0.5	22.9 ± 1.4	1.2 ± 0.4	28.5 ± 0.8
effective molecular size, <sup>b</sup> Å	45.1	36.6	45.5	34.4
apparent molecular weight, <sup>c</sup> kDa	84	73	94	68
% helical content <sup>d</sup>	32.2 ± 3.3	50.4 ± 0.3	30.1 ± 4.4	51.6 ± 1.3

<sup>a</sup> Free amino groups were determined by the method of TNBS. <sup>b</sup> Effective molecular sizes were determined by a size-exclusion chromatography. <sup>c</sup> The apparent molecular weights were determined by SDS-PAGE. <sup>d</sup> Helical contents were estimated by the measurement of CD according to the method of Chang et al. (1978).

た BSA-G-MMC の吸収スペクトルもアシル化法による G-BSA-MMC と同様、MMC の構造に由来する吸収を認めたことから、BSA-G-MMC は BSA と G-MMC が共有結合した高分子ハイブリッド医薬であると考えられた。特に、G-BSA-MMC の MMC 含量は BSA-G-MMC のそれに比べて約 2 倍の高い値を示した (Table 9)。

## 5-2. 物理化学的性質

結合体のアミノ残基量を TNBS を用いた Fields (1972) の方法に従って測定した (Table 9)。BSA はその構造中に、リジンを 59 個含んでいることが知られており、N 末端のアミノ基と合わせると BSA 1 モルは 60 モルのアミノ残基を有する (Reed, 1980)。しかしながら、TNBS 法による BSA の発色は、リジンの  $\epsilon$  アミノ基に換算すると 28.5 モルであり、BSA のアミノ残基の約半分が発色するに過ぎなかった。これは、BSA 分子が局所的あるいは全体的に折り込まれた構造を持つため、埋没状態にあるアミノ基は発色せず、表面に露出したアミノ残基のみが発色したためと考えられた。一方、BSA-G-MMC のアミノ残基の発色は 22.9 モルであった。BSA の値からこの値を差し引くことにより、BSA-G-MMC は BSA 分子 1 モル当り 5.6 モルのアミノ残基が修飾を受けていると考えられた。この修飾量は BSA-G-MMC の BSA 1 モルの当りの MMC 含量 5.59 モルとよく一致した。このことから BSA-G-MMC の場合、G-MMC により修飾を受けたアミノ残基以外のアミノ基は未修飾のままであることが示唆された。これに対して、G-BSA-MMC 並びに G-BSA の発色は、リジンのアミノ基に換算すると 1.5 モル並びに 1.2 モルであり、これらは BSA-G-MMC に比べて、大部分のアミノ残基がグルタル酸により修飾を受けていると判断された。

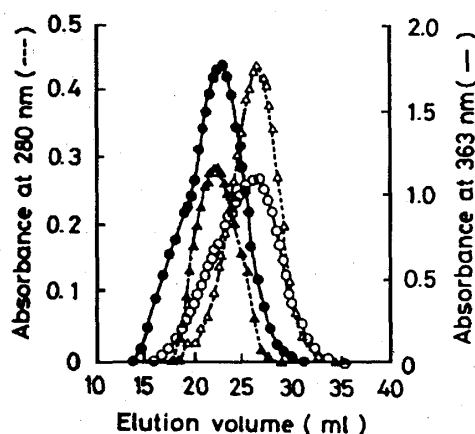


Fig.5 Elution profiles of G-BSA-MMC (—●—), G-BSA (···▲···), BSA-G-MMC (—○—), and BSA (···△···). Size-exclusion chromatography was carried out on a Sephadex G-150 column (1.0×47cm) with 0.2M NaCl at room temperature. G-BSA-MMC and BSA-G-MMC were spectrophotometrically detected at 363 nm, whereas G-BSA and BSA were detected at 280 nm.

断された。

タンパク質の基本的な物性としてストークス径と分子量が挙げられる。一般にタンパク質の分子量測定には、超遠心による方法、浸透圧による方法、分子ふるいによる方法が知られている。中でも分子ふるいによるゲルろ過法並びにゲル電気泳動法は、微量の試料でストークス径並びに分子量の推定が可能である。Fig.5 にセファデックス G150 を用いて得たクロマトグラムを示す。いずれも単一のピークを示したが、BSA-G-MMC の保持容量は BSA と近い値を示したのに対して、G-BSA と G-BSA-MMC では BSA に比べて小さな値であった。そこでこれらの結合体のストークス径

を明らかにするため、標準球状タンパク質を検量線として分析を行ない、Laurent(1984)らの方法に従ってストークス径を求めた(Table 9)。その結果、無水グルタル酸を用いたアシル化(グルタル化)により BSA のストークス径は増大することが明らかになった。BSA のアシル化によるストークス径の増大は、無水コハク酸、無水酢酸を用いた場合(スクシニル化、アセチル化)について認められている。Habeeb(1966)は BSA のストークス径はスクシニル化により約 2 倍に増大し、アセチル化では約 50% 増大したと述べている。これに対して、グルタル化により BSA のストークス径は約 30% 増大したが、Habeeb の行ったスクシニル化やアセチル化に比べると、ストークス径の増大の割合は小さかった。



Fig.6 SDS-PAGE of G-BSA (lane 2), G-BSA-MMC (lane 3), BSA-G-MMC (lane 4), and BSA (lane 5). Aliquots of the sample were dissolved in the SDS-gel loading buffer containing 5% mercaptoethanol, heat-denatured, and loaded on the gel. After electrophoresis, the gel was stained with Coomassie Brilliant Blue. Lane 1 and lane 6 show the migration patterns for the standard proteins.

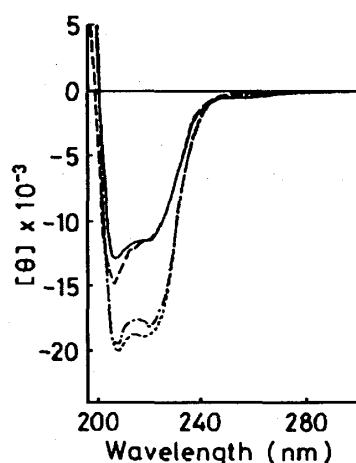


Fig.7 Circular dichroism spectra of G-BSA-MMC (—), BSA-G-MMC (---), G-BSA(· · ·), and BSA (- · -). Each spectrum was recorded in a 0.1mm path length cell on a JASCO J-20C spectropolarimeter equipped with a J-DPZ data processor.

一方、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)存在下におけるポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を行った(Fig.6)。その結果、G-BSA-MMC, G-BSA および BSA-G-MMC はいずれも BSA に比べて大きな分子量を持つことが明らかになり(Table 9)、この分子量の増大は BSA の化学的修飾に由来すると考えられた。

以上、ゲルろ過法による検討から、G-BSA-MMC は BSA-G-MMC に比べて大きなストークス径を有する高分子ハイブリッドであることが明らかになった。このストークス径の差は、合成法の違いに起因すると考えられる。すなわち、G-BSA-MMC においては、アミノ残基の電気的性質がグルタル酸の化学的修飾により正電荷から負電荷へと変化し、ペプチド鎖の高次構造に著しい変化を来したためと考えられる。そこで、これら結合体の二次

構造に関する比較を行った。

一般にタンパク質の二次構造は、主鎖のNHおよびCO基間の相互作用によって $\alpha$ -ヘリックス構造または $\beta$ 構造を形成するか、あるいは不規則な構造（ランダムコイル状態）を有する(Shibata, 1969)。このNHおよびCO基間の相互作用が生じるその電子遷移が変化し、このため円偏光二色性(CD)スペクトルには二次構造を反映した結果が観察される(Hamaguchi, 1971)、BSAのCDスペクトルは222nmと208nmに負の極値を有し、199nm~200nmにクロスオーバーポイントを認めた(Fig.7)。このCDスペクトルのパターンは、 $\alpha$ -ヘリックス構造を取ることが知られているポリ-L-リジンのアルカリ性溶液(pH 11)のパターンとよく一致した(Hamaguchi, 1971)。また、各結合体のCDスペクトルにもBSAと同様の波長において負の極値とクロスオーバーポイントが認められたことから、これらは $\alpha$ -ヘリックス構造を有することが明らかになった。そこでChang(1978)らの式により $\alpha$ -ヘリックス含量を算出した。Table 9に示すようにBSA-G-MMCの $\alpha$ -ヘリックス含量はBSAの値とよく一致した。このことより、活性エステル法によるBSAへのG-MMCの結合は、BSA分子の $\alpha$ -ヘリックス構造に変化を及ぼさないことが明らかになった。これに対してG-BSA-MMCおよびG-BSAの $\alpha$ -ヘリックス含量は、いずれもBSAに比べて約40%減少した。この結果から、グルタル酸の修飾によりBSAの $\alpha$ -ヘリックス構造は著しく減少することが明らかになった。このグルタル化による $\alpha$ -ヘリックス構造の変化は、Changらのスクシニル化による変化と同様の結果であった。以上の結果より、G-BSA-MMCの化学的性質と高次構造はBSAに比べて大きく異なっているのに対して、BSA-G-MMCではBSAに近いものであると判断した。

### 5-3. 薬剂的性質ならびに制癌効果

#### 5-3-1. プロドラッグとしての性質

結合体はいずれもBSAの腫瘍集積性を利用するMMCの高分子プロドラッグとして合成したものである。理想的な抗腫瘍性高分子プロドラッグの姿としては、脈管系に投与後、プロドラッグの状態では循環して腫瘍部位に集積し、そこで腫瘍細胞に取り込まれたのち、MMCを遊離放出して制癌効果を発現することが望ましい。したがって、結合体の安定性を検討することは重要である。結合体のMMCの結合様式はいずれもグルタル酸を介

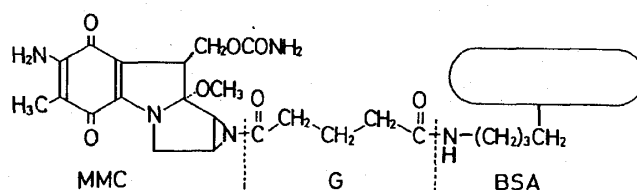
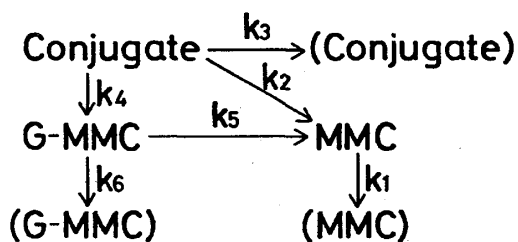


Fig. 8 Structure of G-BSA-MMC and BSA-G-MMC



Scheme 4 Decomposition Model of G-BSA-MMC and BSA-G-MMC  
 Conjugate: G-BSA-MMC and BSA-G-MMC;  
 G-MMC: Glutaryl MMC; MMC: Mitomycin  
 C: (Conjugate), (G-MMC), (MMC): decomposition product;  $k_1 \sim k_6$ : rate constant

した結合である (Fig.8)。したがって、BSA とグルタル酸の結合部およびグルタル酸と MMC の結合部が結合体の分解部位として考えられる。また、結合体から遊離した MMC は更に分解を受けることが考えられる。

そこで各結合体の分解に関して Scheme 4 に示すモデルを考えた。安定性の実験は種々の pH のリン酸緩衝溶液 ( $\mu = 0.3, 37^\circ\text{C}$ ) 中でインキュベーションを行い、

メディウム中の各結合体、G-MMC 並びに MMC の濃度を UV 法と HPLC 法により測定した。その結果、結合体の減少はいずれも片対数グラフ上で直線的であった (Fig.9)。一方、いずれの結合体をインキュベートした場合でもメディウム中に G-MMC は全く検出されず、結合体からは MMC のみが遊離放出されることが明らかになった。この知見から、

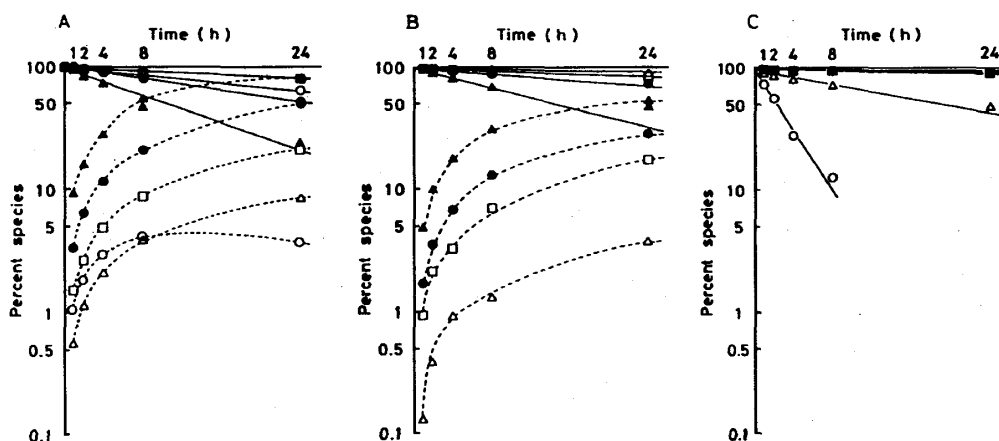
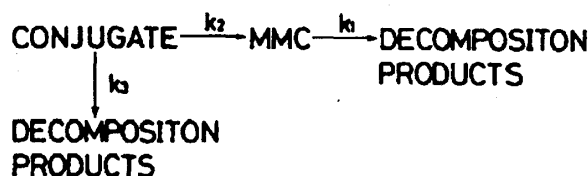


Fig.9 Stability of G-BSA-MMC (A), BSA-G-MMC (B), and MMC (C) in 0.1M phosphate buffer solution ( $\mu=0.3$ ) of pH5.0( $\circ$ ), 6.0( $\Delta$ ), 7.4( $\square$ ), 8.0( $\bullet$ ), and 9.0( $\blacktriangle$ ) at  $37^\circ\text{C}$ . The dashed lines represent the time course of the regeneration of MMC from the conjugates.



Scheme 5 Decomposition Model of G-BSA-MMC or BSA-G-MMC



BSA とグルタル酸の酸アミド結合に比べて、MMC とグルタル酸の酸アミド結合は不安定であると考えられた。また、各結合体は MMC を放出することから、MMC の高分子プロドラッグとして作用することが示唆された。

そこで、結合体の分解に関して、Scheme 5 に示すモデルを想定し、式(1)、(2)を導いた。

$$[\text{Conjugate}] = [\text{Conjugate}]_0 e^{-(k_2 + k_3)t} \quad (1)$$

$$[\text{MMC}] = \frac{k_2 [\text{Conjugate}]_0}{k_1 - k_2 - k_3} \{ e^{-(k_2 + k_3)t} - e^{-k_1 t} \} \quad (2)$$

$[\text{Conjugate}]_0$  は G-BSA-MMC または BSA-G-MMC の初期濃度を示す。式(1)、(2)に従って、非線形最小二乗法プログラム MULTI(Yamaoka, 1981)を用いて同時当てはめを行った。その結果、キャリアタンパク部の分解や MMC 部分の分解といった MMC 放出以外の分解過程である  $k_3$  の値はいずれもゼロに近い負の値に収束し、この過程は無視できることが明らかになった。そこで、結合体の分解は MMC の放出過程( $k_2$ )のみによると考え、式(3)、(4)を用いて計算を行った。

$$[\text{Conjugate}] = [\text{Conjugate}]_0 e^{-k_2 t} \quad (3)$$

$$[\text{MMC}] = \frac{k_2 [\text{Conjugate}]_0}{k_1 - k_2} \{ e^{-k_2 t} - e^{-k_1 t} \} \quad (4)$$

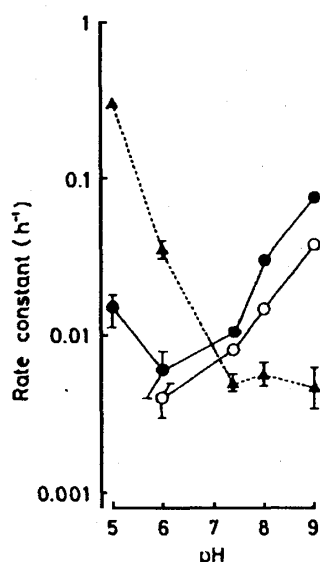


Fig.10 pH profile of the rate constants in the formation of MMC from the conjugates ( $k_2$ ) and the degradation of MMC ( $k_1$ ) in 0.1M phosphate buffer solutions ( $\mu=0.3$ ) at 37°C: —●—, G-BSA-MMC; —○—, BSA-G-MMC; ···▲···, MMC. Vertical bars represent SD calculated from 15-20 sets of experimental data by the least-squares method.

Fig.10に計算で得られた各速度定数の pH プロファイルを示す。G-BSA-MMC および BSA-G-MMC は、いずれも酸性溶液中で MMC に比べて安定であることが明らかになった。この安定性の改善は、MMC の低分子プロドラッグである G-MMC では認められなかったことから、BSA をキャリアとして利用した高分子プロドラッグ化の有用性が示唆された。一方、結合体からの MMC の遊離放出速度定数( $k_2$ )は、アルカリ性において pH の増大とともに大きくなった。また、MMC はアルカリ性において安定であることから、結合体から分解放出された MMC は緩衝溶液中で安定に存在するものと考えられ、速度定数( $k_1$ )はほぼ

一定に保たれた。

上記の MMC の遊離放出速度に関して G-BSA-MMC と BSA-G-MMC を比較すると、G-BSA-MMC の  $k_2$  は、pH6.0-9.0 において BSA-G-MMC のそれに比べて大きな値であった。既に述べたように、G-BSA-MMC はグルタル酸によりキャリアタンパク部のアミノ基の大部分が修飾を受けた高分子であるのに対して、BSA-G-MMC では G-MMC によりアミノ残基の一部が修飾を受けた高分子である。この化学構造の違いが、MMC の遊離放出速度に影響を及ぼすと考えられた。高分子プロドラッグの構造とその分解に関して、デキストランと薬物のエステル結合の加水分解は、分子内で近接する炭水化物の水酸基により触媒作用を受けることが指摘されている (Larsen, 1987)。本研究においては、分子内のカルボニル基が酸アミドの加水分解を触媒することが推測されるが、詳細については今後の検討課題のひとつにしたいと考えている。

### 5-3-2. 体内動態特性と腫瘍集積性

ラットにおける結合体の体内動態を MMC と比較するとともに、固形腫瘍モデルマウスにおける体内動態と腫瘍指向性について検討した。まず、MMC を Wistar 系雄性ラットの静脈内に投与し、経時的に採血を行い、HPLC 法により血漿中の MMC 濃度を測定した (Fig.11)。MMC は静注後、血漿中から速やかに消失し、その消失パターンは 2-コンパートメントオープンモデルに従うと考えられた。そこで非線形最小二乗法プログラム MULTI を用いて、薬動学的パラメータを算出した。その結果、分布相の半期 ( $t_{1/2}, \alpha$ ) は

3.24±1.08min であり、消失相における半減期 ( $t_{1/2}, \beta$ ) は 22.8±9.8min であった。

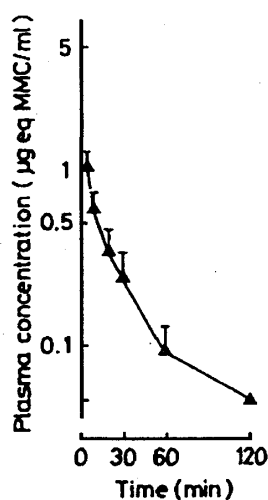


Fig.11 Plasma concentrations of MMC after a single intravenous injection of 1mg/kg of MMC in rats. Each point represents the mean value and SD of three rats.

各結合体をラットに静注した際の血漿中の結合型および遊離型の MMC 濃度を Fig.12 に示す。G-BSA-MMC 並びに BSA-G-MMC 投与後、各結合体は血漿中より 1 次反応過程に従って消失すると仮定し消失半減期を計算したところ、それぞれ 40min と 50min であることが明らかになった。両者の消失半減期の差はそれぞれからの MMC の遊離放出に遅速があるため生じたものと考えられた。そこで、血流速度が大きく脈管系に富み循環血流量の大きい臓器(腎、肝、脾、心、肺など)への分布は、極めて速やかに血中と平衡が成り立つと仮定したモデルを想定し、血漿中の遊離 MMC 濃度をもとに体内

での結合体からの MMC 遊離放出速度定数を算出した。その結果、生体内における G-BSA-MMC 並びに BSA-G-MMC からの MMC の遊離放出に関する半減期はそれぞれ 17.4min と 59.8min であった。これらの値は *in vitro* 系における各結合体からの MMC の分解放出に関する半減期（それぞれ、66h と 84h）に比べて著しく短いものであった。更に、血漿中薬物濃度-時間曲線を確率的過程とみなすモーメント解析(Yamaoka, 1984)により検討を行った。すなわち、体内における G-BSA-MMC 並びに BSA-G-MMC からの MMC の遊離放出過程に関する平均時間（平均放出時間）を算出した。その結果、各結合体の平均放出時間は、それぞれ  $11.4 \pm 4.5$ h と  $3.3 \pm 1.4$ h であった。この様にモデルを想定しないモーメント解析の結果からも、MMC を血清アルブミンと結合することにより、結合体は MMC を供給する高分子として作用し、MMC の生体内における持続化が可能であることが示唆された。これと同様の結果は、デキストランと MMC の結合体においても知られており(Hashida, 1983, 1984)、本知見と総合すると、一般に高分子ハイブリッド化により MMC の持続化が可能であると考えられた。

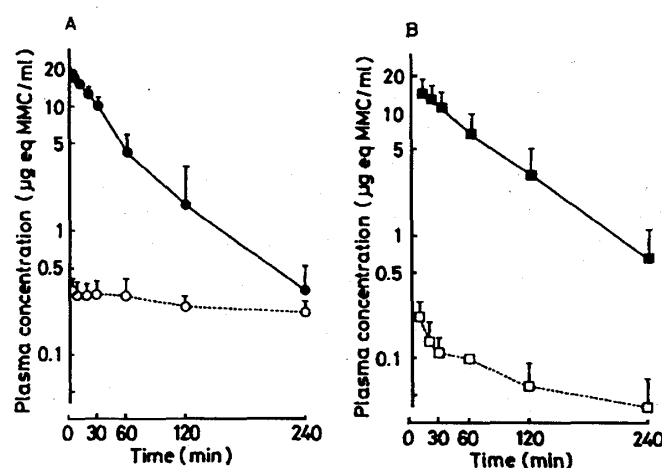


Fig. 12 Plasma concentrations of the conjugated MMC (closed symbols) and the released MMC (open symbols) after a single intravenous injection of G-BSA-MMC (A) and BSA-G-MMC (B). Each dose was 0.5mg/kg in MMC equivalents. Each point represents the mean value with SD of three rats.

ラットの実験から、血清アルブミンをキャリアーとした MMC の高分子ハイブリッドは、生体内で MMC のプロドラッグとして作用し、MMC に比べて持続化することが明らかになり、腫瘍組織への集積が期待された。そこで、固形腫瘍モデルマウスにおける各結合体の体内分布を検討した。その結果、結合体は投与後 1 h 以内で循環血流量の大きい肺、心並びに脈管系に富む肝、脾、腫瘍へ分布した。これは先に想定した結合体に関する体内動態モデルの妥当性を支持する結果であった。更に Fig. 13 に示すように、G-BSA-MMC 並びに BSA-G-MMC は静注後 24h においていずれも腫瘍組織へ分布することが明らかになっ

た。特に、G-BSA-MMC投与後の腫瘍組織には、結合型のみならず遊離型のMMCも認められた。MMCの体内分布に関しては、モルモット(Fujita, 1971)、並びに担癌マウス(Takakura, 1987b)を用いた報告があるが、いずれも投与後の各臓器中にはMMCは検出されていない。これに対して、MMCを高分子ハイブリッド化することにより、MMCの腫瘍組織への分布が著しく改善されることが明らかになった。

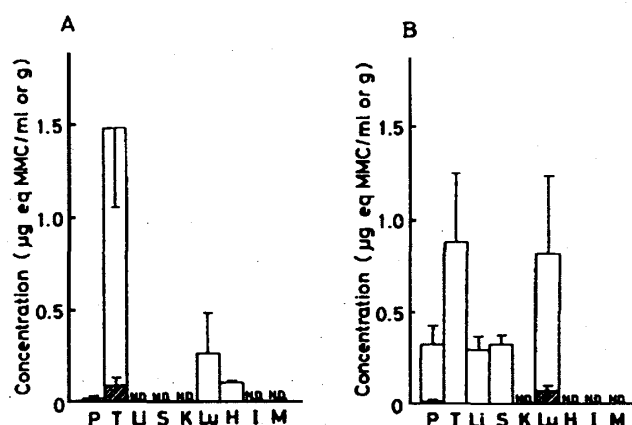


Fig.13 Tissue distribution of the conjugate (open column) and the released MMC (slant lines column) in mice bearing EAC 24h after a single intravenous injection of G-BSA-MMC (A) and BSA-G-MMC (B). The EAC cells ( $1 \times 10^7$  cells/mouse) were inoculated subcutaneously, and 14 days later each conjugate (20mg/kg in MMC equivalents) was administered. Results are expressed as the mean  $\pm$  SD of three mice. Key: P, plasma; T, tumor; Li, liver; S, spleen; K, kidney; Lu, lung; H, heart; I, intestine; M, muscle; ND, not detectable.

ところで、結合体の正常臓器への分布に関して、合成法の違いによる差が認められた。すなわち、G-BSA-MMCの場合、投与後24hにおいて結合型若しくは遊離型MMCとして腫瘍組織のみならず循環血流の大きい肺および心へも分布したが、肺および心への結合型MMCの分布濃度は腫瘍組織へのそれに比べていずれも低濃度であった。これに対して、BSA-G-MMCの場合、投与後24hにおいて血漿、肝、脾、特に肺への結合型並びに遊離型MMCの分布濃度は腫瘍組織への結合型MMCの分布濃度に比べて無視できない濃度であった。これらの知見から、BSA-G-MMCはG-BSA-MMCに比べて腫瘍組織のみならず細網内皮系へも蓄積することが明らかになった。また、G-BSA-MMCとBSA-G-MMCの肝に対する分布の差は、すでに明らかにした結合体の化学的性質や立体構造の違いに由来することが考えられた。特に、アシル化法により合成したG-BSA-MMCは、BSAのグルタル酸の修飾による負電荷の導入とストークス径の増大を特徴とする高分子ハイブリッドであり、肝への分布に関する知見は、Kooistra(1980)らによるアシル化したタンパク質が肝に取り込まれにくいという報告や、高分子の肝取り込みに対する電荷の影響に関

する報告(Nakane, 1988)と矛盾しなかった。

一方、G-BSA-MMCに比べて $\alpha$ -ヘリックス含量やストークス径といった立体構造がBSAと類似していると考えられるBSA-G-MMCは、肺への分布濃度が高く、血清アルブミンに関するDavis(1986)らの知見と一致した。また、Taylor(1970)らは肺の上皮組織に40-50 Åのポアが存在することを指摘しており、先に明らかにしたG-BSA-MMCとBSA-G-MMCのストークス径の差が肺への分布の違いをもたらす原因であると推測した。

このように、結合体の正常臓器への分布は合成法の違いにより著しく変化し、グルタル酸修飾BSAを使用して調製されたストークス径の大きいG-BSA-MMCは、 $\alpha$ -ヘリックス含量やストークス径といった立体構造がBSAと類似していると考えられるBSA-G-MMCに比べて、より特異的に腫瘍組織へ分布することが明らかになった。この知見から、適当な化学修飾を施すことにより、血清アルブミンの体内動態を制御することが可能であると考えられた。この体内動態の制御は高分子キャリアーとしての有用性を向上させるものである。そこで現在、生体高分子の体内動態に対するアシル化並びにPEG化の影響について検討を行っている。

### 5-3-3. 制癌効果

制癌効果の評価系は大きく分けて*in vitro*と*in vivo*系のものに分類できる。*In vitro*系は、培地中の腫瘍細胞の増殖を阻害する効果を評価するものであるのに対して、*in vivo*系は腫

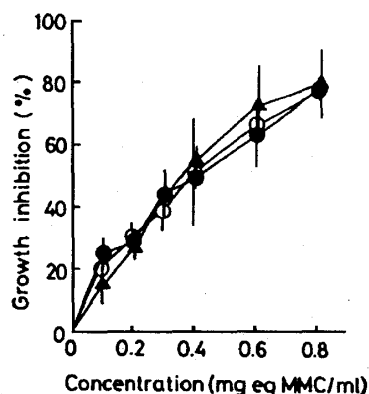


Fig. 14 Cytotoxicity of G-BSA-MMC (●), BSA-G-MMC (○), and MMC (▲) against the S180 cell line. S180 cells were cultivated in the medium containing each test compound for 3 days, and the number of viable cells was determined by the trypan blue exclusion method. Growth inhibition (%) =  $(C-T)/C \times 100$ , where  $T$  and  $C$  represent the number of surviving cells in a treated group and that in an untreated group, respectively. Vertical bars represent SD of three experiments.

瘍細胞をマウス等の実験動物へ移植し、これに検体を投与して腫瘍増殖抑制効果や延命効果を評価するものである。著者らは、固形腫瘍由来の腹水型細胞であるSarcoma 180 (S180) 細胞を用いて、高分子ハイブリッドとMMCの制癌活性を比較した。Fig. 14に示すように、*in vitro*評価系において各結合体はMMCと同様、S180細胞に対して濃度依存的に細胞増殖阻害効果を示した。50%の増殖阻害効果を示す濃度( $IC_{50}$ )で見ると、各結合体のS180細胞増殖阻害効果はMMCとほぼ同程度であった(Table 10)。この検討は三日間のインキュベーション結果であるが、同時にメディウム中の遊離型のMMCの濃度をHPLC法で定量し

Table 10 Cytotoxicity, Antitumor Activity, and Acute Toxicity of G-BSA-MMC, BSA-G-MMC, and MMC

treatment	cytotoxicity: <sup>a</sup> IC <sub>50</sub> , mg/mL in MMC equivalents	% survival after 40 days <sup>b</sup>	no. of mice	LD <sub>50</sub> : <sup>c</sup> mg/kg in MMC equivalents
G-BSA-MMC	0.4	75.0	8	51.1
BSA-G-MMC	0.4	100.0	6	67.3
MMC	0.3	71.4	14	11.1
control		39.3	27	

<sup>a</sup> S180 cells were cultivated in the medium containing each test compound for 3 days, and the number of viable cells was determined by the trypan blue exclusion method. Values express as the concentration required to produce 50% inhibition of growth. <sup>b</sup> Mice were inoculated subcutaneously with S180 cells ( $1 \times 10^7$  cells/mouse). Four days after the inoculation, mice were treated by single intravenous injection of G-BSA-MMC (20 mg/kg in MMC equivalents), BSA-G-MMC (20 mg/kg in MMC equivalents), or MMC (5 mg/kg). <sup>c</sup> Acute toxicity was evaluated with the survival on the 7th day after the intravenous single injection of the test compound to male ddY mice. LD<sub>50</sub> values were determined according to the method of Dixon (1965).

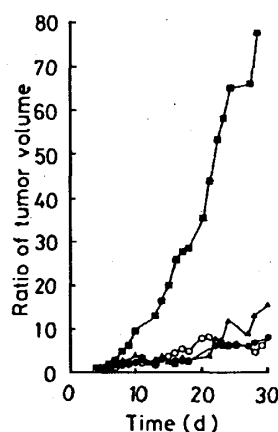


Fig. 15 Growth inhibitory effects of G-BSA-MMC, BSA-G-MMC, and MMC on implanted S180 tumor. Mice were inoculated with S180 cells ( $1 \times 10^7$  cells/mouse) subcutaneously. Four days after the inoculation, a single intravenous dose of the test compound was administered as follows: ●, G-BSA-MMC (20mg/kg in MMC equivalents); ○, BSA-G-MMC (20mg/kg in MMC equivalents); ▲, MMC (5mg/kg); ■, control (0.9% NaCl, 10 mL/kg). The ratio was calculated by dividing the tumor volume by the reference volume 4 days after the inoculation. Each point represents the mean value of the ratio ( $n = 6-27$ ).

与群に認められた副作用、例えば投与部位の壊死並びに下痢とそれに伴う体重減少は、いずれの結合体を投与した群においても観察されなかった。さらに、簡便な方法ではあるが、up and down法(Dixon, 1965)により各結合体の LD<sub>50</sub> を測定した(Table 10)。その結果、G-BSA-MMC と BSA-G-MMC の LD<sub>50</sub> はそれぞれ MMC として 51.1mg/kg と 67.3

たところ、遊離型 MMC 濃度はいずれの結合体をインキュベートした場合も、MMC インキュベートに比べて低い値であった。これらの知見を総合すると、各結合体の示す増殖阻害効果は、高分子プロドラッグとしての作用によるだけではなく、結合体自体に備わった制癌活性に由来していると考えられた。

一方、*in vivo* 評価系としては、S180 細胞をマウスの腋下部皮下に投与して作成した固形腫瘍モデルを使用した。このモデルの腫瘍増殖は著しく、作成後 30 日間で初期の約 80 倍の大きさにまで増大し、40 日後にはその 60% が死亡した(Fig. 15, Table 10)。これに対して、各結合体を単回静注することにより腫瘍増殖が顕著に抑制されることが明らかになった。さらに 40 日後の生存率はそれぞれ 75.0% (G-BSA-MMC) と 100% (BSA-G-MMC) であり、いずれもコントロール群に比べて増大した。各結合体を MMC として 20mg/kg 静注した際の *in vivo* 系における制癌効果は、MMC を 5mg/kg 静注した場合とほぼ同程度であった。しかしながら、MMC 投

mg/kg であった。これらの値は MMC の LD<sub>50</sub> である 11.1mg/kg に比べて約 5~6 倍であり、各結合体は MMC に比べて毒性の低いものであることが明らかになった。この急性毒性に関する知見と、*in vivo* 系での制癌効果に関する知見を総合すると、これら高分子ハイブリッドは MMC に比べて安全係数の高い薬物であることが示唆された。

#### 【おわりに】

制癌薬の高分子ハイブリッド医薬化は、その治療効果を向上させ副作用の軽減を図るものである。本総説では、生体高分子をキャリアーとして利用する試みを紹介し、血清アルブミンを用いた高分子ハイブリッドに関する知見について述べた。これらの研究はいずれも基礎的なものであり、実用化に至るまでには数々の問題を乗り越える必要がある。一般に、高分子ハイブリッド医薬にはその不均一な化学構造や免疫原性の問題がある。これらの問題点を解決し、いま臨床応用の最右翼にあるものとして、SMANCS と PEG 修飾アスパラギナーゼが挙げられる。蛋白およびペプチド性医薬品が大きな位置を占めようとしている現在、高分子ハイブリッド医薬化は微量の有効成分を効率よく標的部位へ送達する手法として、今後も注目されるものと考えられる。このような状況の下、著者らは血清アルブミンだけでなく、アシアロフェツイン、トランスフェリン、免疫グロブリンなどの生体高分子を薬物担体とした薬物の標的部位指向化に関する研究を展開している。

#### 文献

- Aoki, H., Takaki, T. and Terada, H. (1984) 血清アルブミン、講談社、東京。
- Balboni, P. G., Minia, A., Grossi, M. P., Barbanti-Brodano, G., Mattioli, A. and Fiume, L. (1976) *Nature*, **264**, 181.
- Chang, T. C. and Sun, S. F. (1978) *Int. J. Peptide Protein Res.*, **11**, 65.
- Chu, B. C. F. and Whiteley, J. M. (1977) *Mol. Pharm*, **13**, 80.
- Dixon, W. J. (1965) *J. Am. Statist. Assoc.*, **60**, 967.
- Fields, R. (1972) *Methods Enzymol.*, **25**, 464.
- Fiume, L., Mattioli, A., Balboni, P. G., Tognon, M., Barbanti-Brodano, G., DeVries, J. and Wieland, Th. (1979) *FEBS Lett.*, **103**, 51.
- Fujita, H. (1971) *Jap. J. Clin. Oncol.*, **12**, 151.
- Furumo, K., Miwa, N. and Kato, K. (1983) *J. Biochem.*, **93**, 249.
- Gregoriadis, G. (1984) *Nature*, **310**, 186.
- Habeeb, A. F. S. A. Cassidy, H. G. And Singer, S. J. (1958) *Biochem. Biophys. Acta*, **29**, 587.
- Habeeb, A. F. S. A. (1966) *Biochim. Biophys. Acta*, **121**, 21.

- Halbert G. W., Florence A. T. and Stuart J. F. B. (1987) *J. Pharm. Pharmacol.*, **39**, 871.
- Halbert, G. W. and Florence, A. T. (1989) *J. Pharm. Pharmacol.*, **41**, 222.
- Hamaguchi, K. and Takesada, K. (1971) 生物化学実験法 **6**, 蛋白質の旋光性  
<ORDとCD>, 学会出版センター.
- Hara, K. (1987) *Oncologia*, **20**, 42.
- Harding, N. G. L. (1971) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **186**, 270.
- Hashida, M., Takakura, Y., Matsumoto, S., Sasaki, H., Kato, A., Kojima, T.,  
Muranishi, S. and Sezaki, H. (1983) *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 2055.
- Hashida, M., Kato, A., Takakura, Y. and Sezaki, H. (1984) *Drug Metab. Dispos.*,  
**12**, 492.
- Hashida, M. (1992) *Drug Delivery System*, **7**, 5.
- Honda, K. (1978) *Drug Delivery System*, **2**, 134.
- Irie, R. and Hatta, M. (1986) 蛋白質 核酸 酵素, **31**, 1501.
- Iskiker, H. C., Cerottini, J. C., Jatton, J. C. and Mesgrnst, G. (1964) *Specific and  
Nonspecific Fixation of Plasma Proteins in Tumors*, Elsevier, Amsterdam, p.  
278.
- Iwasa, S., Konishi, E., Kondo, K., Suzuki, T., Akaza, H. and Nijima, T.  
(1987). *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 1128.
- Jain, R. K. (1987) *Cancer Metas. Rev.* **6**, 559.
- Kamisaki, Y., Wada, H., Yagura, T., Matsushima, A. and Inada, Y. (1981) *J.*  
*Pharm. Exp. Ther.*, **21**, 410.
- Kaneo, Y., Tanaka, T. and Iguchi, S. (1990) *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 2614.
- Kaneo, Y., Tanaka, T. and Iguchi, S. (1991) *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 999.
- Kato, A., Takakura, Y., Hashida, M., Kimura, S. and Sezaki, H. (1982) *Chem.*  
*Pharm. Bull.*, **30**, 2951.
- Kato, Y., Tsukada, Y., Hara, T. and Hirai, H. (1983) *J. Appl. Biochem.*, **5**, 313.
- Klapper, M. H. and Klotz, I. M. (1972) *Method Enzymol.*, **25**, 531.
- Kubo, A. (1985) がん化学療法、南山堂、東京、p.56.
- Kobayashi, A., Oda, T., and Maeda, H. (1988) *J. Bioactive and Compatible  
Polymers*, **3**, 319.
- Kojima, T., Hashida, M., Muranishi, S. and Sezaki, H. (1980) *J. Pharm.*  
*Pharmacol.*, **32**, 30.
- Kooistra, T., Duursma, A. M., Bouma, J. M. W. and Gruber, M. (1980)



- Biochim. Biophys. Acta, **631**, 439.
- Kramer, P. A. (1974) J. Pharm. Sci., **63**, 1646.
- Larsen, C. and Johansen, M. (1987) Int. J. Pharmaceut., **35**, 39.
- Laurent, T. C. and Killander, J. (1964) J. Chromatogr., **14**, 317.
- Maeda, H. (1981) 生物化学実験法 **12**, 蛋白質の化学修飾<上>、大野素徳ら、学会出版センター.
- Maeda, H., Seymour W. L. and Miyamoto, Y. (1992) Bioconjugate Chem, **3**, 351.
- Magenat, G., Schindler, R. and Esliker, H. (1969) Eur. L. Cancer, **5**, 33.
- Matsumura, Y. and Maeda, H. (1986) Cancer Res., **46**, 6387.
- Morimoto, Y., Natsume, H., Sugibayashi, K. and Fujimoto, S. (1989) Int. J. Pharmaceut., **54**, 27.
- Nakane, S., Matsumoto, S., Takakura, Y., Hashida, M. and Sezaki, H. (1988) J. Pharm. Pharmacol., **40**, 1.
- Onishi, H. and Nagai, T. (1987) Chem. Pharm. Bull., **35**, 1183.
- Otagiri, M. (1985) 代謝, **22**, 1207.
- Philips, F. S., Schwartz, H. S. and Sternberg, S.S (1960) Cancer Res., **20**, 1354.
- Poznansky, M. J. (1977) Biomedical Applications of Immobilized Enzymes and Proteins 2, ed. by Chang, T. M. S., Plenum Press, New York, p.341.
- Poznansky, M. J. (1979) Life Sci., **24**, 153.
- Poznansky, M. J. and Cleland, L. G. (1980) Drug Delivery System, ed. by Juriano, R. L., Oxford University Press, New York, p.253.
- Reed, R. G., Putnam, F. W. and Peters, T. J. (1980) Biochem. J., **191**, 867.
- Roos, C. F., Matsumoto, S., Takakura, Y., Hashida, M. and Sezaki, H. (1984) Int. J. Pharmaceut., **22**, 75.
- Ryser, H. J. -P., (1967) Nature, **215**, 934.
- Sanzgiri, Y. D., Blanton, C. D. Jr. and Gallo, J. M. (1990) Pharm. Res., **7**, 418.
- Sezaki, H. and Hashida, M. (1985) Directed Drug Delivery, ed. by Borchardt, R. T., Repta, A. J. and Stella, V. J., Humana Press, Clifton, p.189.
- Sezaki, H. (1989) Yakugaku Zasshi, **109**, 611.
- Shibata, K. (1969) 生物化学実験法 **3**, 高次構造の化学的研究法、学会出版センター、p.3.
- Shouval, D., Adler, R., Wands, J. R., Hurwitz, E., Issebacher, K. J. and Sela, M. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **85**, 8276.
- Sugiura, K. (1961) Cancer Chemother. Reports, **13**, 51.

- Suzuki, T. Sato. E., Goto, K., Katsurada, Y., Unno, K. and Takahashi, T. (1981) *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 844.
- Szekerke, M. and Horvath, M. and Erchegyi, J. (1974) *FEBS Letters*, **44**, 160.
- Szekerke, M. and Driscoll, J. A. (1977) *Eur. J. Cancer*, **13**, 529.
- Takakura, Y., Kitajima, M., Matsumoto, S., Hashida, M. and Sezaki, H. (1987a) *Int. J. Pharmaceut.*, **37**, 135.
- Takakura, Y., Takagi, A., Hashida, M. and Sezaki, H. (1987b) *Pharm. Res.*, **4**, 293.
- Takakura, Y., Fujita, T., Hashida, M. and Sezaki, H. (1990) *Pharm. Res.*, **7**, 339.
- Tanaka, K. (1988) 現代の薬理学、金原出版、東京、p.487.
- Tanaka, T., Kaneo, Y. and Iguchi, S. (1991) *Bioconjugate Chem.*, **2**, 261.
- Tanaka, T., Kaneo, Y. and Iguchi, S. (1993) Abstracts of Papers, The 113th Annual Meeting of Pharmaceutical Society of Japan, Osaka, March, 4-p.22.
- Taylor, A. E. and Gaar, K. A. J. (1970) *Am. J. Physiol.*, **218**, 1133.
- Trouet, A., Campeneere, D. D. and Duve, C. (1972) *Nature New Biology*, **239**, 110.
- Trouet, A., Masquelier, M., Baurain, R. and Campeneere, D. D. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 626.
- Umemoto, N., Kato, Takeda, Y., Saito, M., Hara, T., Seto, M. and Takahashi, T. (1984) *J. Appl. Biochem*, **6**, 297.
- Urushizaki, U. and Kohgo, Y. (1986) *Igakuno Ayumi*, **138**, 377.
- Wakaki, S., Marumo, H., Tomioka, K., Shimizu, G., Kato, E., Kamada, H., Kudo, S. and Fujimoto, Y. (1958) *Antibiot. Chemother.*, **8**, 228.
- Whiteley, J. M., Nimec, Z. and Galivan, J. (1980) *Mol. Pharmacol.*, **19**, 505.
- Yamaoka, K. (1984) マイコンによる薬物体内動態解析法、南江堂。
- Yamaoka, K., Tanigawara, Y., Nakagawa, T. and Uno, T. (1981) *J. Pharm. Dyn.*, **4**, 879.